

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1927-1928. — N° 184

L'ACÉTATE DE BENZIDINE

RÉACTIF HISTO-CHIMIQUE

(Travail du Laboratoire de Botanique et de Matière médicale)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Mention " PHARMACIE "

présentée et soutenue publiquement le mercredi 30 mai 1928

PAR

Henri-Auguste ROQUES

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX,
PRIX DES TRAVAUX PRATIQUES, 1921-1922 ET 1922-1923 (Médailles d'argent),
PRIX DE LA FACULTÉ, 1923-1924 (Médaille d'or),
PRIX DE LA VILLE DE BORDEAUX, SCIENCES NATURELLES, 1923-1924 (Médaille de vermeil),
PRÉPARATEUR AU LABORATOIRE DE BOTANIQUE ET DE MATIÈRE MÉDICALE.

Né à PUY-L'ÉVÊQUE (Lot), le 30 avril 1900.

Examineurs de la Thèse	{	MM. BEILLE, professeur.	Président.
		MANDOUL, professeur	Juges.
		R. SIGALAS, agrégé	
		GOLSE, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE DE L'ACADÉMIE ET DES FACULTÉS

Y. CADORET
17, RUE POQUELIN-MOLIÈRE, 17

1928



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1927-1928. — N° 184

L'ACÉTATE DE BENZIDINE

RÉACTIF HISTO-CHIMIQUE

(Travail du Laboratoire de Botanique et de Matière médicale)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Mention " PHARMACIE "

présentée et soutenue publiquement le mercredi 30 mai 1928

PAR

Henri-Auguste ROQUES

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX.
PRIX DES TRAVAUX PRATIQUES, 1921-1922 ET 1922-1923 (Médailles d'argent),
PRIX DE LA FACULTÉ, 1923-1924 (Médaille d'or),
PRIX DE LA VILLE DE BORDEAUX, SCIENCES NATURELLES, 1923-1924 (Médaille de vermeil),
PRÉPARATEUR AU LABORATOIRE DE BOTANIQUE ET DE MATIÈRE MÉDICALE.

Né à PUY-L'ÉVÊQUE (Lot), le 30 avril 1900.

Examineurs de la Thèse	{	MM. BEILLE, professeur.	<i>Président.</i>
		MANDOUL, professeur	{ <i>Juges.</i>
		R. SIGALAS, agrégé	
		GOLSE, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE DE L'ACADÉMIE ET DES FACULTÉS

Y. CADORET
17, RUE POQUELIN-MOLIÈRE, 17

1928

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

M. SIGALAS..... Doyen.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM LANELONGUE, BADAL, POUSSON, MOURE, PRINCETEAU
W. DUBREUILH, RIVIÈRE

PROFESSEURS

MM.			MM
Clinique médicale	VERGER.	Zoologie et parasitologie	MANDOUJ.
id.	CASSAET.	Médecine expérimentale	MAURIAC.
Clinique chirurgicale	CHAVANNAZ.	Clinique ophtalmologique	TEULIÈRES.
id.	BÉGOUIN.	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ROCHER
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.	Clinique gynécologique	GUYOT.
Clinique d'accouchements	N.	Clinique médicale des maladies des enfants	CRUCHET.
Anatomie pathologique et microscopie clinique	SABRAZÈS.	Chimie biologique et médicale	DENIGÈS.
Anatomie	VILLEMIN.	Physique médicale et pharmaceutique	SIGALAS.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUILH.	Médec. coloniale et clinique des malad. exotiques	LE DANTEC.
Physiologie	PACHON.	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	PETGES.
Hygiène	AUCHÉ.	Clinique des maladies des voies urinaires	DUVERGEY
Médecine légale et déontologie	LANDE.	Clinique des maladies nerveuses et mentales	ABADIE
Electroradiologie et clin. d'électricité médicale	RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Chimie	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée	BARTHE.
Botanique et matière médicale	BEILLE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie	SELLIER
Pharmacie	DUPOUY.		

MM. LABAT (Pharmacie). — DELAUNAY (Physiologie).
MICHELEAU, LEURET, DUPÉRIÉ (Médecine générale).



AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.			MM.
Anatomie	DUBECQ.	Maladies mentales	PERRENS.
Histologie	LACOSTE.	Chirurgie générale	PAPIN.
Anatomie pathologique	MURATET.	id.	JEANNENEY.
Parasitologie et sciences naturelles	R. SIGALAS.	id.	CHARRIER.
Histoire naturelle pharmaceutique	FOURMENT.	id.	LOUBAT.
Médecine générale	CHREYX.	Obstétrique	PERY.
id.	BONNIN.	id.	FAUGÈRE.
id.	AUBERTIN.	Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
id.	DAMADE.	Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
id.	PIÉCHAUD.	Pharmacie	GOLSE.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.			MM.
Clinique dentaire	CAVALIÉ.	Démonstrations et préparations pharmaceutiques	LABAT
Médecine opératoire	PAPIN.	Pharmacie chimique	GOLSE
Ophtalmologie	GABANNES.	Chimie minérale	GOLSE.
Puériculture	ANDÉRODIAS		

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes .. MM. N.
Cours complémentaire annexé — Prothèse et rééducation professionnelle GOURDON.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

A MA MÈRE

Modeste témoignage de filiale affection.

A MON PÈRE

*Ingénieur des Ponts et Chaussées,
Chevalier de la Légion d'honneur.*

Témoignage de grande reconnaissance.

A MA FIANCÉE

MADemoiselle HENRIETTE ROUQUET

A l'aurore d'une nouvelle vie de bonheur et d'espérances, il m'est particulièrement doux de vous dédier cette thèse. Veuillez voir dans l'exposé de ces recherches scientifiques le témoignage de ma profonde et très tendre affection.

A MADAME ET A MONSIEUR GEORGES ROUQUET

Receveur de l'Enregistrement à Orléansville.

Bien faible témoignage d'une reconnaissance infinie.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MES MAÎTRES
DE LA FACULTÉ ET DES HOPITAUX DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. MANDOUL

*Professeur de zoologie et de parasitologie à la Faculté de médecine
et de pharmacie de Bordeaux,
Docteur ès sciences,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique,
Officier de Nichan-Iftikhar.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F. VILLEMIN

*Professeur d'anatomie à la Faculté de Médecine de Bordeaux,
Croix de guerre,
Officier de Sainte-Anne de Russie,
Officier d'Académie.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ R. SIGALAS

*Chef des travaux de zoologie et de parasitologie,
Directeur du Laboratoire maritime de l'École des Hautes Études,
Directeur de la Station biologique d'Arcachon,
Croix de guerre,
Officier d'Académie.*

A MONSIEUR NEYRAUT

Préparateur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR C. SIGALAS

*Doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Correspondant national de l'Académie de Médecine,
Officier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.*

Hommage de profonde et grande reconnaissance.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR LUCIEN BEILLE

*Professeur de Botanique et Matière médicale
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique,
Officier du Dragon de l'Annam.*

MON CHER MAÎTRE,

Dès notre arrivée à la Faculté, vous nous avez accepté dans votre Laboratoire et vous avez fait de nous votre collaborateur. Votre magistral enseignement, vos méthodes scientifiques, vos conseils éclairés, furent pour nous le plus précieux des guides dans l'acquisition du meilleur de nos connaissances scientifiques. Puisse ce modeste travail être le témoignage d'une reconnaissance infinie.

L'ACÉTATE DE BENZIDINE

RÉACTIF HISTO-CHIMIQUE

INTRODUCTION

Le travail que nous présentons aujourd'hui comme sujet de thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux, section pharmacie, résume un ensemble de recherches histo-chimiques sur les pentosanes et les lévulosanes que nous poursuivons depuis plusieurs années dans le laboratoire de botanique et de matière médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux.

Elles reposent sur une réaction colorée que nous avons constatée en étudiant la localisation des oxydases végétales. Nous avons remarqué que l'acétate de benzidine colorait fortement en jaune les pentosanes, donnait avec les lévulosanes des réactions de cristallisation et fixait les mucilages. Nous sommes parti de ces faits pour étudier plus spécialement les pentosanes, les lévulosanes et les mucilages. L'histologiste doit non seulement chercher à localiser les principes immédiats, mais rechercher leur origine, leur métabolisme, leur rôle dans l'organisme et demander à la chimie l'explication des phénomènes si complexes qui se produisent dans la cellule. Il est cependant difficile

d'expliquer, d'après les réactions qu'on obtient *in vitro*, les transformations de la matière vivante. Pour élucider ces questions parfois si difficiles, l'histologiste doit rechercher des réactions aussi sensibles que possible, en fixer les conditions et en discuter minutieusement les résultats.

L'étude des pentosanes est beaucoup plus vaste que nous ne l'avions pensé dès le début et nous nous sommes trouvé dans l'obligation de limiter la présente étude à la recherche objective des pentosanes, des lévulosanes et des mucilages.

PLAN DU TRAVAIL

INTRODUCTION.

CHAPITRE PREMIER. — *L'acétate de benzidine, réactif histo-chimique des parois cellulaires modifiées.*

- A. Étude histo-chimique des membranes cellulaires chez les végétaux et leurs modifications.
- B. Action de l'acétate de benzidine sur les membranes renfermant le groupement ($C^6H^{10}O^5$).

CHAPITRE II. — *L'acétate de benzidine, réactif histo-chimique des lévulosanes.*

- A. Les lévulosanes et leurs modifications.
- B. Action de l'acétate de benzidine sur les lévulosanes.
- C. Applications à l'histo-chimie.

CHAPITRE III. — *L'acétate de benzidine, réactif histo-chimique des mucilages.*

- A. Les mucilages, leurs classifications.
- B. Techniques de fixation et de coloration des mucilages.
- C. Action de l'acétate de benzidine sur les mucilages.
- D. Applications à l'histo-chimie.

CONCLUSION.

CHAPITRE PREMIER

L'acétate de benzidine, réactif histo-chimique des parois cellulaires modifiées.

A. — Étude histo-chimique des membranes cellulaires chez les végétaux et leurs modifications.

On admettait jusqu'aux travaux de MANGIN que la membrane végétale était composée de cinq sortes de celluloses :

I. Cellulose attaquable par le *Bacillus Amylobacter*. Soluble dans le réactif de Sweizer ;

II. Cellulose non attaquable par le *Bacillus Amylobacter*. Soluble dans le réactif de Sweizer ;

III. Cellulose non soluble dans le réactif de Sweizer, non attaquable par le *Bacillus Amylobacter* ;

IV. Méta-cellulose ;

V. Cellulose des lichens, bleuisant directement par l'iode. On savait néanmoins à cette époque que, dans les cellules agrégées en tissus, la lamelle moyenne était formée par une substance n'ayant pas les réactions de la cellulose.

Les travaux de FRÉMY avaient cependant fourni des indications précieuses sur la composition du squelette des végétaux. D'après cet auteur, les tissus des fruits et des racines renfermaient un principe, la *pectose*, d'où dérive la pectine. MAUDET montrait également que la moelle de certains arbres renfermait de la pectose et du pectate de chaux, ces substances jouant le rôle de ciment et réunissant les cellules entre elles. MANGIN, en 1888 [1], confirma et compléta les recherches de Frémy et de

Maudet. Les membranes végétales seraient constituées par trois substances fondamentales (cellulose, pectose, callose) existant à l'état isolé ou unies entre elles dès leur origine. Ces substances, à leur tour, seraient susceptibles de s'imprégner de matières incrustantes d'origine minérale ou d'origine organique ou de se modifier.

I. **La cellulose.** — Substance incolore, amorphe, insoluble dans les dissolvants ordinaires (eau, alcool, alcalis, acides). Soluble dans la liqueur cupro-ammoniacale. Les agents oxydants la transforment en oxy-cellulose, puis en acide oxalique. On la caractérisait autrefois avec la réaction de PAYEN (SO^4H^2 iodé). Ce réactif est d'un emploi délicat, et, de plus, il détruit rapidement les tissus. NÖGELI, en 1858, la caractérise avec le chlorure de zinc iodé. Ce réactif, plus facile à employer que le précédent, présente lui aussi des inconvénients : 1° sa concentration variable et mal définie ne permet pas toujours d'obtenir des résultats identiques ; 2° son action n'est visible qu'au bout de plusieurs heures.

MANGIN [2] s'est adressé à un grand nombre de sels ou d'acides et il a constaté que la plupart des sels métalliques en solution très concentrée exercent sur la paroi cellulosique des modifications qui sont rendues visibles par la coloration bleue ou violette que l'iode fait apparaître. Les substances minérales employées : 1° doivent être très concentrées ; 2° elles doivent être sans influence sur l'iode.

MANGIN a surtout employé les réactions suivantes :

1° Acide phosphorique iodé. Coloration bleue ou violet noir ;

2° Chlorure de calcium iodé. Coloration bleue ;

3° Chlorure d'aluminium iodé. Coloration bleue ou violet noir ;

4° Bichlorure d'étain iodé. Coloration bleu ciel.

Les colorants organiques sont d'un emploi plus courant et donnent de meilleurs résultats. Les uns colorent la cellulose dans un bain acide ou neutre (Orseilline BB, noir Naphтол, etc.), les autres la colorent dans un bain alcalin (rouge Congo, benzo-azurine, etc.).

Sous l'influence d'agents oxydants, la cellulose est susceptible

de se transformer en oxy-cellulose; cette transformation peut se produire sous l'influence de composés chimiques, de diastases oxydantes ou de bactéries. Il est de grande utilité pour l'histologiste de savoir caractériser ces composés à fonctions *carboxylique* et *aldéhydrique*, car ils diminuent la résistance des fibres, et, de plus, ils possèdent certaines propriétés chimiques communes à d'autres matières organiques incrustant les membranes cellulaires.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous les principaux procédés employés par A. RUBY pour déceler les oxy-celluloses et les méthodes qui permettent d'apprécier leur importance.

Méthodes basées sur	I. La présence de groupes aldéhy- diques " CHO " dans la molécule de l'oxycellulose, qui lui communi- quent.....	1° Des proprié- tés réductri- ces se mani- festant par l'action.....	A. Sur la li- queur de Feh- ling.	a) Méthode de SCHWALBE.		
				b) Méthode de HAGGLUND.		
			2° La propriété de recolorer la fuchsine décolorée par le SO ³ .	3° La propriété de brunir par le chauffage avec les alcalis.	4° La propriété de réagir avec les hydrazines.	B. Sur certaines matières colo- rantes à la cuve, notamment sur le Flavanthrène.
	II. La présence de groupes carboxy- les " COOH " dans la molécule de l'oxycellulose, qui lui communi- quent.....	1° La propriété de fixer les bases.....	2° Une affinité particulière pour les matières colo- rantes basiques et notamment pour le bleu de méthylène.	3° La propriété de réagir sur la β naphthorésorcine.	A. Alcalines (SCHWALBE).	
					B. Alcalino-terreuses (BECKER).	
					C. De certains sels métal- liques neutres.	
III. La propriété de l'oxycellulose de donner du furfurol par distillation avec HCL.						

II. La pectose. — Substance incolore et amorphe. Les matières oxydantes la transforment en acide mucique. Insoluble dans la liqueur cupro-ammoniacale. Se colore faiblement par les réactifs iodés.

Les colorants organiques qui se fixent sur la pectose appartiennent à la série basique.

Les principaux sont :

- 1° Groupe azoïque : Brun Bismarck ;
- 2° Groupe du diphénylméthane : Auramine ;
- 3° Groupe du triphénylméthane : Vert brillant, bleu Victoria, violet de Paris, violet dahlia, etc. ;
- 4° Groupe des oxazines : Violet solide, bleu de Nil ;
- 5° Groupe des eurhodines : Violet neutre, safranine T ;
- 6° Groupe de couleurs de thionine : Bleu de méthylène ;
- 7° Se colore en rose par la safranine, en rouge par le rouge de ruthénium.

Toutes ces substances sont solubles dans l'eau. Un petit nombre de colorants solubles dans l'alcool, tels que le bleu de Nicholson, le bleu de diphénylamine, les indulines ont une certaine affinité pour les composés pectiques.

III. La callose. — Substance incolore, amorphe, insoluble dans l'eau, dans l'alcool, dans le réactif cupro-ammoniacal. Très soluble dans la potasse et la soude à 1 p. 100. Soluble dans l'acide sulfurique, le chlorure de calcium, le bichlorure d'étain concentré. Elle est insoluble à froid dans les carbonates alcalins et l'ammoniaque, qui la gonflent en la rendant gélatineuse (distinction avec les composés pectiques). L'azo-bleu, l'azo-violet, la benzoazurine colorent différemment la cellulose et la callose ; ils ne colorent pas les composés pectiques. Les bleus solubles colorent la callose en bleu verdâtre ; ils ne colorent ni la cellulose ni les composés pectiques.

La membrane cellulaire jeune est constituée par de la cellulose pure. Elle reste à cet état dans quelques parties du végétal, mais elle se modifie en s'incrustant de matières minérales (silice, carbonate de chaux) ou organiques (lignine, subérine, cutine). Les prêles, les graminées, les diatomées s'incrustent de

produits siliceux et il est alors évident que ces matières s'intercalent par intersusception entre les mollécules de la cellulose. Ces dépôts peuvent être soit localisés, soit étendus à toute la paroi cellulaire. Ainsi l'on trouve des amas de carbonate de chaux dans la membrane cellulaire des corallines. Chez les conifères, il se forme dans l'épaisseur même de la membrane des cristaux d'oxalate de chaux.

IV. **Lignification.** — Beaucoup de cellules végétales ont la propriété de se lignifier. Toute membrane lignifiée comprend [3] :

- 1° Une substance fondamentale ;
- 2° Une substance incrustante ;
- 3° Des matières accessoires.

La substance fondamentale se montre constituée par 80 p. 100 de cellulose pure ou associée à d'autres anhydrides (mannane, galactane, xylane). Les réactions colorées des membranes lignifiées sont nombreuses. Nous citerons plus spécialement les suivantes :

- 1° Solution aqueuse concentrée de phénol ordinaire additionnée de ClO^3K à saturation et d' HCl , coloration bleue ;
- 2° Naphtol α en solution alcoolique à 15 p. 100 additionné d' HCl , coloration bleu verdâtre ;
- 3° Phloroglucine additionnée d' HCl , coloration rouge ;
- 4° Thymol résorciné en solution alcoolique additionné d' HCl , coloration bleue.

On peut aussi employer pour colorer de tels tissus des amines aromatiques ou des couleurs d'aniline. Par exemple, du sulfate d'aniline additionné d'acide sulfurique donne une coloration jaune.

V. **Subérification.** — Elle résulte de la transformation de la paroi cellulaire en liège, et forme ainsi les éléments d'un tissu imperméable et, partant, protecteur de l'humidité.

GILSON a trouvé dans le liège du *Quercus Suber* 44 p. 100 d'acides gras, 36 p. 100 d'acide subérique, 8 p. 100 phellonique et une petite quantité d'acide phloïnique. La membrane subérifiée contient, en outre, des hydrates de carbone (pentosanes,

15 p. 100), des substances aromatiques, des tanins, une *phytostérine*, des matières minérales. Les membranes subérifiées sont insolubles dans le réactif cupro-ammoniacal, elles se colorent en brun par le chlorure de zinc iodé, enfin elles se colorent comme les corps gras par la teinture d'orcanette et le Soudan III.

VI. *Cutine*. — Elle se produit sur la paroi externe des cellules et paraît avoir une constitution chimique voisine de la subérine. Elle est cependant plus résistante à l'action des acides minéraux, des alcalis, de l'eau de javel. Traitée par le chlorure de zinc iodé, elle se colore en brun foncé, enfin elle se colore comme les corps gras par la teinture d'orcanette et le Soudan III.

B. — Action de l'acétate de benzidine sur les membranes renfermant le groupement ($C^6H^{10}O^5$) [4].

L'acétate de benzidine colore rapidement les parois lignifiées, cutinisées, subérifiées en jaune et, suivant certaines conditions à déterminer la coloration varie du jaune paille au jaune orangé.

La réaction ne réussit pas avec les matériaux fixés au formol. Il y a, dans ce cas, des composés amorphes qui masquent les détails de la préparation. La réaction est instantanée; quelques secondes à peine suffisent et la coupe présente dans les régions d'élection la teinte jaune indiquée ci-dessus. Il suffit de verser un peu du réactif sur de la sciure de bois pour constater macroscopiquement la coloration obtenue. Nous avons ici non point une simple fixation d'un colorant sur la paroi cellulaire, comme cela se produit avec le vert d'iode par exemple, mais une véritable réaction chimique, l'acétate de benzidine étant à peu près incolore. Certes, comme nous l'avons déjà indiqué, les réactions de coloration de tels tissus différenciés sont nombreuses. Notre réaction nous paraît présenter un avantage marqué sur celles qui ont été utilisées jusqu'à ce jour. En effet, les colorants de l'aniline agissant comme le fait une teinture sur une fibre ont l'inconvénient de masquer les fins détails des préparations.

Les autres réactions agissent brutalement par suite de l'emploi

d'acides ou de bases fortes. Les acides sulfurique et chlorhydrique, l'ammoniaque, les oxydants (ClO^3K , MnO^4K , etc.) désorganisent profondément les membranes cellulaires et sont responsables de bien d'erreurs d'interprétations. L'acétate de benzidine n'agit pas sur les membranes de cellulose pure et sur les membranes débarrassées des pentosanes qu'elles renferment. On peut cependant constater qu'il augmente la réfringence des cellules et rend plus nette la lamelle mitoyenne de MANGIN. Il agit au contraire remarquablement sur les membranes incrustées de pentosanes, et pour obtenir les réactions les plus nettes il convient d'opérer comme suit :

Acide acétique cristallisable...	10 cc.
Acétate de benzidine pur	1 gramme.
Eau.....	30 cc.

Dissoudre à chaud. Étendre à 50 cc. Laisser refroidir, filtrer et conserver dans un flacon en verre jaune.

Les coupes sont immergées quelques instants dans le réactif, puis lavées.

La coloration est rapide, les cellules ne sont pas altérées. On peut obtenir une double coloration. Après la réaction ci-dessus, laver soigneusement et traiter par l'un des réactifs suivants :

Solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 p. 1.000, qui colore la cellulose en bleu ;

Hémalun qui colore la cellulose en violet ;

Benzo-azurine, qui colore la cellulose en bleu et la callose en violet.

CHAPITRE II

L'acétate de benzidine, réactif histo-chimique des lévulosanes.

A. — Les lévulosanes et leurs modifications.

En 1804, Valentin ROSE [5] découvrait dans la racine de l'*Inula Helenium* un glucide lévogyre donnant par hydrolyse du lévulose. Il l'appela *inuline*. Plus tard, l'*inuline* fut trouvée dans des plantes appartenant à d'autres familles (composées, campanulacées, goodéniacées, violacées, etc.). On pensait alors que ce glucide était un corps unique, toujours identique à lui-même. VILLE et JOULIE (1866) [6] retirent du jus de topinambour, traité par l'alcool, une substance qu'ils croyaient différente de l'*inuline* et qu'ils nommèrent *lévuline*. L'année suivante, DUBRUNFANT signalait dans les racines du topinambour la présence d'un produit gommeux, optiquement neutre sur la lumière polarisée, que DIECK et TOLLENS proposèrent d'appeler *synanthrine*. MÜLLER (1873) [7] retire la *triticine* du chiendent. EKSTRAND et JOHANSON (1888) [8] découvrent la *graminine* dans le *trisetum alpestre*. TANRET (1889) [9] retira du topinambour et de l'aunée cinq principes lévogyres (*inuline*, *pseudo-inuline*, *hélianthénine*, *inulinéine*, *synanthrine*); il démontra que la *lévuline* de VILLE et JOULIE n'était autre chose qu'un mélange de saccharose et de principes voisins de l'*inuline*. Il n'en fallait pas plus pour démontrer que les inulines dites « substances lévogyres des monocotylédones » étaient, en réalité, un mélange complexe d'*inuline* et de composés voisins. On donna à tous ces composés lévogyres, qui fournissent par hydrolyse du lévulose, le nom générique de lévulosanes.

L'étude microchimique des lévulosanes chez les végétaux reposant sur quelques-unes de leurs propriétés physico-chimiques, nous croyons utile de rappeler leurs principales réactions.

Inuline ($C^6H^{10}O^5$) $_nH^2O$. — Pouvoir rotatoire (α_D) = — 36° 40. Desséchée : poudre blanche, translucide à une température élevée, peu soluble dans l'eau à froid, très soluble à chaud ; précipite à froid en granules irréguliers ; insoluble dans l'alcool et l'éther. Anhydre fond à 178 degrés ; à une température plus élevée, elle brunit et le pouvoir rotatoire change de sens. Elle donne un précipité blanc avec l'eau de chaux, le chlorure d'étain, de plomb, de cuivre, les sels de mercure, l'acétate de plomb ammoniacal. MÜLLER et DUBRUNFANT admettent plusieurs hydrates d'inuline. KILIANI admet un seul hydrate d'inuline.

Pseudo-inuline ($C^6H^{10}O^5$) $_2H^2O$. — Pouvoir rotatoire (α_D) = — 32° 2. Desséchée : poudre blanche et translucide. Soluble à froid dans 350 parties d'eau, très soluble à chaud dans l'eau et l'alcool faible, insoluble dans l'alcool froid. Précipitée par l'eau de chaux et l'acétate de plomb ammoniacal.

Hélianthénine ($C^6H^{10}O^5$) $^{123}H^2O$. — Se présente sous la forme de fines aiguilles microscopiques formant des agrégats sphériques. Soluble dans son poids d'eau froide, très soluble dans l'alcool faible, exige pour se dissoudre 7,5 parties d'alcool à 60 degrés. Fond à 176 degrés. Ne précipite ni par la baryte, ni par le sous-acétate de plomb.

Inulinéine. — Pouvoir rotatoire (α_D) = — 29° 6. Cristallise sous forme de fines aiguilles réunies en étoiles à 6 rayons ou nucléées 2 à 2. Se dissout dans quelques parties d'eau froide, dans 35 parties d'alcool fort, dans 24,5 parties d'alcool à 50 degrés. Non précipitée par la baryte.

Depuis les travaux de TANRET, on a signalé d'autres lévulosanes (*triticine*, *graminine*, *inuline d'ail*, *inuline d'asphodèle*).

Triticine et graminine ($C^6H^{10}O^5$) $_n$. — Pouvoir rotatoire de la triticine (α_D) = — 44 degrés. Pouvoir rotatoire de la graminine (α_D) = — 47 degrés. L'abaissement du point de congélation de ces glucides indique qu'il s'agit de grosses molécules. La triticine commence à brunir à 160 degrés et fond à 198 degrés. La

graminine brunit à 195 degrés et fond à 199 degrés. Insolubles par les sels de métaux lourds. Donnent avec la baryte des combinaisons insolubles.

Inuline d'asphodèle ($C^6H^{10}O^8$)ⁿ. — Pouvoir rotatoire (α_D) = — 18 degrés. Desséchée : poudre blanche, inodore, insipide, très fortement hygroscopique. Très soluble dans l'eau froide. Chauffée, brunit à 170 degrés, fond en se décomposant à 210 degrés. Glucide à petite molécule. Dérivé calcique soluble dans l'eau et l'alcool faible ; composé barytique soluble, mais précipitable par addition d'alcool.

Inuline d'ail. — Pouvoir rotatoire (α_D) = — 30 degrés. Desséchée : poudre blanche, amorphe, à saveur acide. Absorbe rapidement l'humidité de l'air en formant une pâte épaisse.

Soluble en toute proportion dans l'eau froide, très soluble dans alcool à 70 degrés. *Incrystallisable* dans les cellules.

Les propriétés physico-chimiques des quelques lévulosanes que nous avons brièvement étudiées plus haut nous laissent prévoir qu'il existe dans le règne végétal une foule de composés lévogyres dont la formule générale est $(C^6H^{10}O^8)^n$ et qui ne se différencient que par des variations de solubilité, du point de fusion et du pouvoir rotatoire. Il s'agit de savoir si les lévulosanes extraites des végétaux ne subissent pas, pendant leur extraction, des altérations capables de modifier leur édifice moléculaire. Les expériences ci-dessous montrent bien leur instabilité :

1° Si l'on traite une solution d'inuline par de l'alcool fort, on obtient des sphéro-cristaux solubles dans l'eau. La même expérience, répétée avec le même produit six mois plus tard, donne des sphéro-cristaux difficilement solubles dans l'eau ;

2° Du suc de dahlia ou de topinambour filtré se trouble de plus en plus, et un quart d'heure après, il forme une bouillie épaisse qui ne laisse échapper aucune goutte d'eau si l'on retourne le vase ;

3° Du suc de topinambour refroidi jusqu'à congélation, puis abandonné à lui-même jusqu'à ce qu'il ait repris la température ambiante, donne une bouillie cristalline qui, examinée au

microscope, se montre formée par de petits bâtonnets de 2 à 3 μ .

Tous ces faits expérimentaux nous laissent supposer que les lévulosanes étudiées par les chimistes ne répondent qu'approximativement à la forme sous laquelle elles se trouvent dans les cellules.

Les réactions micro-chimiques des lévulosanes sont peu nombreuses et même inapplicables à certains de ces corps (*inuline d'ail*).

Pour les mettre en relief, on utilise :

1° La déshydratation par l'alcool fort ;

2° La congélation.

L'inuline se précipite alors sous la forme de sphéro-cristaux bi-réfringents appliqués contre la paroi cellulaire.

D'autres composés minéraux et organiques (phosphate de chaux, tyrosine, hespéridine, sucres, alcaloïdes) donnent aussi dans les mêmes conditions des cristallisations analogues.

On les différencie par les procédés suivants :

a) **Réaction de Molisch.** — Mettre sur la préparation 1 goutte de solution alcoolique de naphтол α , puis 1 goutte de SO^4H^2 . Les cristaux de lévulosanes se colorent en violet. En remplaçant le naphтол α par le thymol, on obtient une coloration rouge ;

b) **Réaction de Green.** — Mettre sur la préparation 1 goutte de solution d'orcine, puis 1 goutte d'HCl concentré. Les cristaux de lévulosanes se dissolvent et l'on obtient une coloration rouge orangé ;

c) **Réaction de Tunmann.** — Traiter les coupes par un mélange de pyrogallol et d'HCl. Chauffer légèrement. On voit apparaître une coloration rouge violet.

B. — Action de l'acétate de benzidine sur les lévulosanes [40].

En étudiant à l'aide de l'acétate de benzidine les parois cellulaires, nous avons constaté :

1° Que ce réactif précipite des solutions même très diluées de formol ;

2°. Que certaines cellules mucilagineuses donnent, avec le réactif, de petits cristaux bi-réfringents présentant au microscope polarisant le phénomène de la croix.

Nous avons songé tout d'abord à appliquer cette réaction à la recherche du formol dans les végétaux. On sait combien la caractérisation de l'aldéhyde formique dans la plante est difficile, et l'on peut dire que sa caractérisation dans les cellules végétales n'a pas encore été démontrée d'une façon indubitable. POLACCI et KIMPELEIN [11] emploient du bi-sulfite de rosaniline et du méthyl paraminometacresol. ROUGE [12] constate que les réactions du formol ne sont pas dues à ce produit, mais bien à de l'aldéhyde glycolique. En effet, lorsque l'on soumet l'hydrazone formée à la réaction (oxydation par FeCl_3 plus HCl), on n'obtient pas la réaction rouge framboisé que le formol provoque dans ces conditions, même à la dilution du millionième. Des résultats négatifs furent signalés par WILLSTATTER et STOLL [13]. Des traces infinitésimales de formol donnant en présence du réactif un précipité amorphe, nous avons essayé de rechercher par ce moyen la présence de cet aldéhyde dans les tissus de la plante et nous avons obtenu les mêmes précipités amorphes dans les feuilles au voisinage des stomates. Mais nous devons reconnaître que si cette méthode de caractérisation du formol chez les végétaux n'est pas plus spécifique que les autres, elle devait nous permettre d'orienter nos recherches vers la caractérisation des lévulosanes.

Si on immerge des fragments de plantes à lévulosanes dans le réactif, au bout de très peu de temps, quelquefois même instantanément, on obtient des sphéro-cristaux dans les *feuilles* et dans les *pétioles*, aussi bien que dans les tiges et les racines. La caractérisation des lévulosanes dans les organes verts des végétaux est d'une importance capitale, car elle soulève de nouveau le problème de la synthèse de ces glucides dans le règne végétal. Les anciens admettaient que le même amidon transitoire, élaboré dans les feuilles, puis solubilisé et transporté jusqu'aux organes de réserve, se transforme en inuline, tandis qu'il repasse à l'état d'amidon dans le tubercule de la pomme de terre.

GRAFE et VOUK [14] signalent la présence d'hydrates de carbone lévogyres dans les feuilles de la Chicorée de Magdebourg ou Chicorée de Brabant (parenchyme foliaire 2,9 p. 100 d'inuline; nervure médiane, 4,24 p. 100 d'inuline). Mais la plupart des auteurs modernes nient encore la présence de substances lévogyres dans les parenchymes verts. Voici, par exemple, sur la présence des hydrates de carbone dans les feuilles des plantes à lévulosanes, quelques données précises effectuées par COLIN [15]. Le matériel soumis à l'analyse a toujours été récolté en fin de journée.

R, S, A, L (α) désignent respectivement :

- α : Pouvoir rotatoire global ;
- R. : Sucre réducteur ;
- S. : Saccharose ;
- A. : Amidon ;
- L. : Lévulosanes.

Hydrates de carbone des feuilles.

ESPÈCES	PARTIES ANALYSÉES	α	R	S	A	L
Chicorée de Magdebourg.....	Parenchyme vert.....	+ 20	0,24	0,12	0	0
	Nervure médiane.....	+ 31	0,91	0,10	0	0
	Pétiole.....	+ 32	0,77	0,10	0	0
Topinambour.....	Parenchyme vert.....	+ 1	0,34	0,29	0,60	0
	Nervures et pétiole.....	+ 15	0,56	0,46	0,50	0
Blé.....	Limbe.....	+ 54	0,49	1,86	0	0
	Gaine.....	— 4	1,06	1,65	0	2,71
Aunée.....	Limbe.....	+ 35	0,67	1,08	»	0
	Nervure médiane.....	+ 40	0,50	0,32	»	0
Avoine.....	Limbe.....	+ 48	0,21	1,48	0	0
	Gaine.....	— 17	0,15	0,50	0	0,90

D'après cet auteur, l'absence de glucides dans les feuilles des plantes à lévulosanes permet de conclure que la formation de ces glucides ne résulte pas, comme celle de l'amidon, de la fonction chlorophyllienne. Elle dériverait de la transformation de matières amylacées en lévulose sous l'influence de diastases végétales, puis par un mécanisme inverse de la reconstitution de la molécule hydro-carbonée. S'il est aisé de réaliser la trans-

formation des glucides en sucre au moyen des diastases, il est impossible avec ces ferments de remonter à la formation des lévulosanes. On n'a jamais pu reconstituer l'édifice moléculaire détruit, les matériaux employés, comme nous l'avons déjà dit, pouvant eux aussi être inutilisables à la reconstruction de l'édifice moléculaire.

La présence de ces glucides dans les organes verts de la plante nous montre qu'ils résultent de l'assimilation chlorophyllienne, et cela confirme les résultats obtenus par GRAFE et VOUK.

C. — Applications à l'histo-chimie végétale.

Les matériaux d'étude préalablement immergés pendant vingt-quatre heures dans l'acétate de benzidine sont coupés et examinés directement au microscope dans une goutte du réactif.

Nous avons étudié à ce sujet un grand nombre de plantes.

Nous mentionnerons spécialement les suivantes :

L'inuline est localisée comme suit :

LAPPA MAJOR.

Racine : Écorce externe, endoderme, liber, rayons médullaires, moelle.

Tige : Localisation dans les mêmes éléments que la racine et dans quelques poils tecteurs.

Pétiole : Abondante autour des faisceaux libéro-ligneux.

Feuille : Cellules du parenchyme lacuneux, régions endodermiques, faisceaux libéro-ligneux.

Graine : Abondante dans l'amande.

CICHORIUM INTYBUS.

Racine : Même localisation que dans la racine de bardane.

Feuille : Poils, tissus lacuneux, principalement autour des faisceaux libéro-ligneux.

TARAXACUM-DENS-LEONIS.

Racine : Même localisation que dans la racine de bardane.

Feuille : Épidermes, tissus lacuneux, régions endodermiques des faisceaux libéro-ligneux.

Capitule : Présence.

Graine : Présence.

ALLIUM SATIVUM.

Bulbe : Dans toutes les cellules.

Feuille : Épidermes, tissus lacuneux, régions endodermiques des faisceaux libéro-ligneux.

ALLIUM FISTULOSUM.

Racine : Écorce externe, autour des faisceaux libéro-ligneux, moelle.

Feuille : Épiderme supérieur, mésophylle, autour des faisceaux libéro-ligneux.

ASPHODÈLE.

Racine : Écorce externe, régions endodermiques, moelle.

Feuille : Épiderme supérieur, tissus lacuneux, et particulièrement dans l'endoderme qui entoure les faisceaux libéro-ligneux.

Graine : Présence.

Ces recherches nous montrent l'existence de lévulosanes dans tous les organes de la plante, surtout dans les régions endodermiques et autour des faisceaux libéro-ligneux.

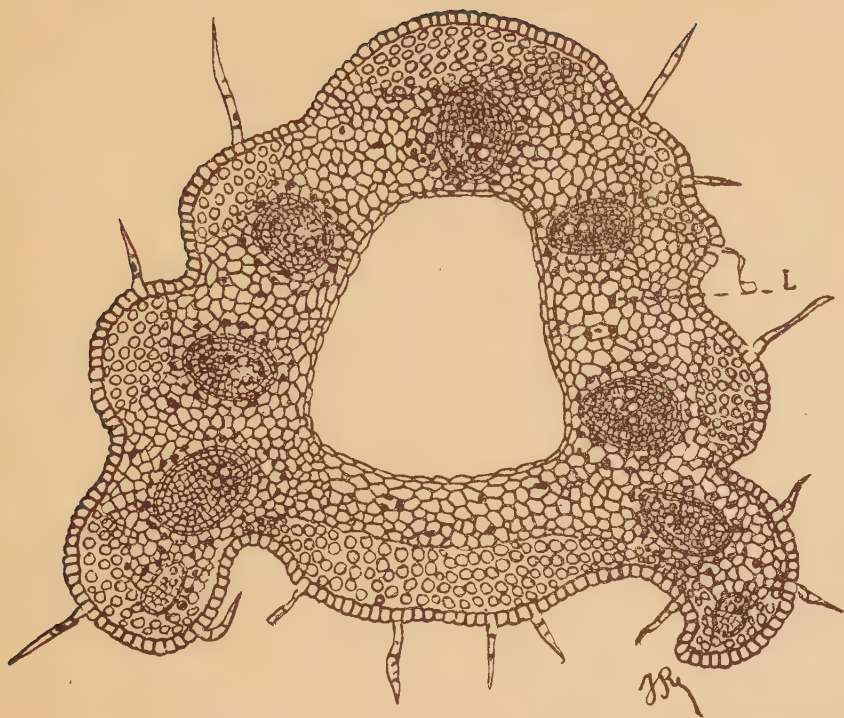


FIG. 1. — Pétiole de *Lappa major* après macération dans l'acétate de benzidine : I, Inuline.

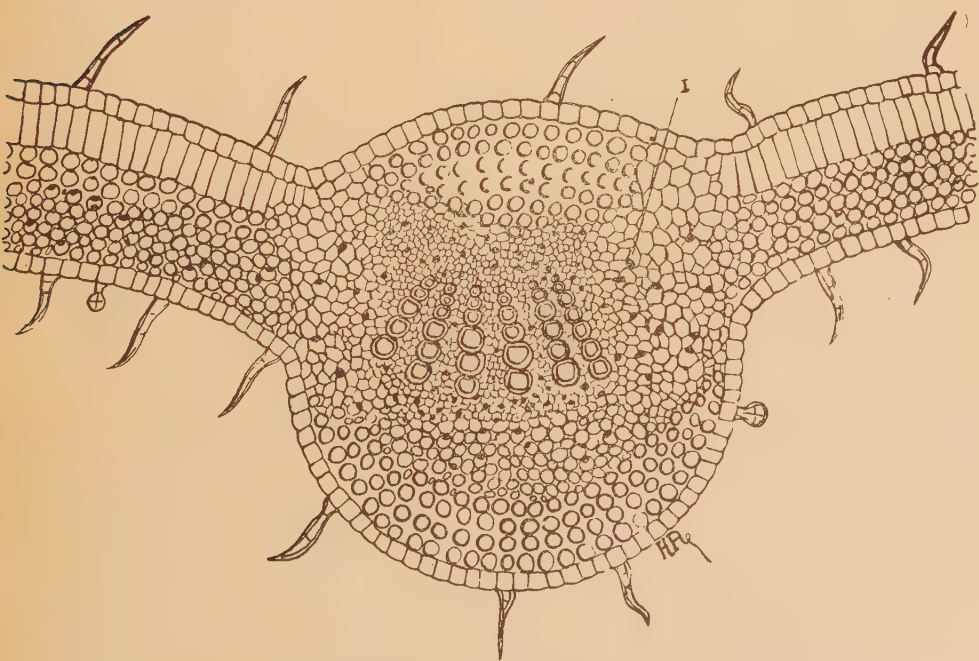


FIG. 2. — Feuille de *Lappa major* après macération dans l'acétate de benzidine : I, Inuline.

CHAPITRE III

L'acétate de benzidine, réactif histo-chimique des mucilages.

A. — Les mucilages, leurs classifications.

C'est surtout dans la paroi externe des cellules des téguments de la graine de lin que les auteurs ont recherché l'origine des mucilages. Deux groupes d'hypothèses ont été émises sur leur mode de formation. La plus ancienne l'attribue à la transformation du contenu cellulaire. La plupart des auteurs modernes, à la suite de KÜTZING et de MANGIN, la rapportent à une transformation de la paroi. Dans une note présentée à la Société de biologie, BRANDZA [16] s'exprime ainsi :

« ... On voit alors sur les coupes transversales observées dans l'alcool ou dans la glycérine que les cellules épidermiques sont remplies d'un contenu brunâtre, contracté et disposé en fer à cheval dans la cavité cellulaire... A l'état de contraction dont nous parlions plus haut, il était facile de constater que le mucilage remplissait les cavités cellulaires, et qu'il ne provient pas, comme plusieurs auteurs le soutiennent, de la gélification au contact de l'eau de la paroi externe des cellules épidermiques, qui se serait considérablement épaissie et transformée. »

BRANDZA explique de la façon suivante l'origine de ce contenu brunâtre :

« Les cellules jeunes sont remplies de grains d'amidon arrondis, isolés ou réunis, amidon qui disparaît peu à peu pour faire place au mucilage. »

KÜTZING [17], le premier, fait dériver le mucilage de beaucoup de graines de la transformation des membranes.

CRAMER [18], dans un travail sur la chimie de la graine de lin, signale les couches stratifiées des cellules mucilagineuses.

HOFFMEISTER [19] constate que la structure de l'assise externe est fortement épaissie et que le vestige de la cavité cellulaire peut être reconnu dans quelques cellules seulement. Pour cet auteur, la cloison externe se gonfle fortement sous l'action de l'eau, tandis que les cloisons latérales se gonflent peu. FRANK [20] reprend l'étude de l'assise mucilagineuse de la graine de lin et en conclut que le mucilage remplit presque entièrement, comme une masse à peine stratifiée, les cavités cellulaires.

MANGIN [21], à la suite d'une étude minutieuse de l'assise à mucilage de la graine de lin, conclut :

« L'assise épidermique de la graine des linées étudiées épaissit et transforme ses membranes pendant la maturation. La membrane interne et parfois une faible étendue des parois radiales se subérifient constamment : tantôt elle s'épaissit à peine (*linum usitatissimum*), parfois elle s'épaissit davantage (*linum peresne*) et acquiert, dans certains cas, une épaisseur considérable (*linum campanulatum*). La membrane externe se compose toujours d'une partie externe faiblement cutinisée, non gélifiable, et de *couches d'apposition secondaires* qui forment le mucilage; elles acquièrent une si grande importance qu'elles font disparaître, au moment de la maturation de la graine, la cavité interne. »

LUTZ [24] étudie la formation du mucilage chez certaines malvacées. Cet auteur remarque dans le tissu collenchymateux des cellules en voie de transformation mucilagineuse. A l'extérieur de chacune de ces cellules, cet histologiste voit, appliquée contre la paroi cellulaire, une couche de mucilage d'épaississement de volume variable. Ce phénomène serait comparable à celui que l'on observe dans les tissus atteints de gommose. Cette couche d'épaississement refoulerait en se formant le protoplasma cellulaire, qui se trouverait ainsi condensé dans la cavité centrale. Les mucilages des malvacées résulteraient donc eux aussi de la transformation de la membrane.

L'étude des parois cellulaires a permis d'établir une classification au moins provisoire. En 1875, GIRAUD divisait ces corps en :

1° Mucilages insolubles dans les acides étendus. Exemple : coing ;

2° Mucilages insolubles dans les alcalis, transformés à chaud par les acides étendus en glucose et en dextrine. Exemple : lin ;

3° Mucilages solubles à chaud dans les alcalis concentrés et transformés par les acides en glucose et dextrine.

TSCHIRCH [22] divise les mucilages en :

1° Mucilages cellulosiques donnant la réaction de la cellulose ;

2° Vrais mucilages ne présentant pas cette réaction.

MANGIN [23] a fourni, en employant des colorants électifs, des données beaucoup plus précises sur ces composés. Il divise les mucilages en :

- a) *Mucilages simples* ;
- b) *Mucilages mixtes* ;
- c) *Mucilages indéterminés*.

a) **Mucilages simples.** — Suivant leur affinité pour les différents colorants des membranes végétales, on peut les diviser en trois groupes :

1° Mucilages cellulosiques ;

2° Mucilages pectosiques ;

3° Mucilages callosiques.

1° *Mucilages cellulosiques.* — Se gonflent lentement dans l'eau, se coagulent par un mélange d'HCl et d'alcool. Ils prennent les colorants de la cellulose, tels que : orseilline BB, noir naphтол en bain acide, rouge Congo, benzo-purpurine en bain alcalin ; sous l'action du réactif iodé, ils prennent une teinte variant du jaune au brun ;

2° *Mucilages pectosiques.* — Extrêmement répandus ; se gonflent rapidement dans une atmosphère humide. Ne se colorent

jamais avec les réactifs de la cellulose. Les réactifs basiques se fixent en bain neutre sur ces mucilages. Les meilleurs colorants sont : le brun Bismarck, le bleu de méthylène, le vert de méthyle, le bleu de Nil, le rouge neutre, l'hématoxyline, le rouge de ruthénium;

3° *Mucilages callosiques*. — Se liquéfient facilement; se colorent en bain acide par le bleu d'aniline, en bain alcalin par les colorants tétrazoïques.

b) **Mucilages mixtes**. — Il peut y avoir trois sortes de mucilages mixtes constitués par le mélange des mucilages simples, cellulosiques, pectosiques, callosiques.

Ils sont formés :

1° De cellulose et de pectose chez les *phanérogames*;

2° De cellulose et de callose chez les *pérosnoporacées*;

3° De callose et de pectose chez les *polyporacées*.

c) **Mucilages indéterminés**. — Il existe un certain nombre de mucilages qui ne rentrent pas dans les catégories ci-dessus citées. En employant les réactifs les plus divers, MANGIN n'a pas réussi à trouver des réactions caractéristiques.

De tels mucilages se rencontrent dans l'albumen de certaines graines et notamment dans le caroubier.

Nous croyons être utile aux histologistes en reproduisant ici un tableau de MANGIN résumant les caractères des principaux mucilages.

Mucilages simples.

I. — CELLULOSIQUES.	II. — PECTOSIQUES.	III. — CALLOSIQUES.
Coagulés par l'alcool chlorhydrique, insolubles dans l'oxalate d'ammoniaque. Se gonflent lentement dans l'eau. Optiquement actifs. <i>Colorants acides tétrazoïdes.</i> 1° Orseille BB, noir naphтол, employés en bain acide; 2° Rouge Congo, benzo-purpurine, benzo-azurine employés en bain alcalin. Mucilages des bulbes d'Orchidées (Salep).	Se gonflent rapidement dans l'eau et se dissolvent presque entièrement. La solution devient fluide avec les alcalis et les acides bouillants. Optiquement inactifs. <i>Colorants basiques.</i> Bleu de méthylène, safranine, bleu de naphthylène, rouge neutre et surtout rouge de rubénum en bain neutre. Cellules à mucilages : Malvacées, Rosacées, Tiliacées, <i>Abies</i>, If, etc. Cellules à raphides : <i>Enothera</i>, <i>Vitis</i>, etc. Canaux mucilagineux : Tilleul, Cycadacées, Ailante, Laminaire. Inuline du grain de pollen : Genévrier, etc. Gaine mucilagineuse de certaines algues : <i>Zygnema</i>, <i>Glaosporum</i>, etc. Mucilage de certains champignons : <i>Bulgaria</i>, <i>Mélissa</i>, etc. Mucilages des conceptacles de Fucus.	Solubles à froid dans les alcalis, l'acide phosphorique, le bichlorure d'étain, etc. Se liquéfient rapidement sans se gonfler. Non colorables et non coagulables à l'état de liquéfaction. Optiquement inactifs. <i>Colorants acides.</i> 1° <i>Tétrazoïques</i> : rosaurine, azo-violet, azo-bleu en bain alcalin; 2° <i>Triphénylméthane</i> : bleu d'aniline en bain acide. Cal des tubes criblés. Membrane des sporanges de Mucorinées (<i>Mucor</i>, <i>Phycomyces</i>, <i>Pilobolus</i>, etc.). Mucilage des cellules-mères des anthères. Cloison de séparation des conidies des Péronosporées, etc.
↑ Mucilage de coing. Mucilage des graines de <i>Sinapis</i>. ↙ Épiderme des graines de divers Plantains. Intine des grains de pollen au niveau des pores et des plis. Épiderme des fruits de <i>Salvia</i>.	↑ Mucilage de la graine de Lin. Mucilage du <i>Chondrus crispus</i>. ↗	
IV. — MUCILAGES MIXTES (cellulosiques et pectosiques).		
V. — MUCILAGES INDÉTERMINÉS. Dépourvus des réactions colorantes qui précèdent. Mucilage de l'albumen de certaines graines : Caroubier, etc.		

B. — Techniques de fixation et de coloration des mucilages.

Les mucilages mis en contact avec un milieu aqueux ou même simplement exposés dans une atmosphère humide gonflent rapidement. Il est nécessaire, pour les localiser dans les cellules végétales, de les précipiter ou de les fixer avant de les soumettre à l'action des colorants. Une foule de réactifs sont susceptibles de précipiter ces composés ; les plus couramment employés sont : l'alun de potassium, l'alun de chrome, l'acétate de plomb, le sulfate ferreux, le sublimé, etc. Ces réactifs ne coagulent qu'imparfaitement les mucilages et nous n'avons pas réussi par ces procédés à obtenir de bonnes préparations. L'alcool, qui serait jusqu'ici le seul fixateur, a le gros inconvénient de rendre les préparations cassantes et d'amener une certaine rétraction de tous les tissus. Il a cependant sur les agents précipitants le réel avantage de fournir des préparations suffisamment nettes et de mettre en évidence l'aspect strié de beaucoup de cellules mucilagineuses.

MANGIN [25] examine les cellules mucilagineuses dans une solution concentrée de glucose.

KRUCH [26] fait usage d'une solution saturée d'hydrate de chloral dans l'alcool absolu auquel il ajoute de la glycérine.

VALLIEZEK [27] emploie l'huile de ricin.

ROUSSEAU [28] remplace l'alcool absolu par l'alcool à 70 degrés.

Quelques auteurs utilisent fréquemment pour l'examen des mucilages la glycérine anhydre.

Les mucilages précipités ou fixés peuvent être colorés par les réactifs les plus divers. Nous pensons être utile aux histologistes en signalant les principaux procédés employés pour la localisation et la coloration des mucilages.

PROCÉDÉ DE LUTZ [29]. — Immerger les coupes dans une solution d'acétate mercurique, les porter dans une solution faible de safranine dans l'alcool. Laver les préparations avec la solution d'acétate mercurique et les plonger dans une solution

de vert acide J. EEE, préparée comme suit (vert J. EEE 0,10, alcool à 90°20, eau distillée 30). Après un dernier lavage avec la solution mercurique, monter les préparations dans la glycérine.

PROCÉDÉ DE DOUBLE COLORATION. — Fixer les coupes par l'eau acétique à 30 p. 100, puis par l'alcool à 90 degrés. Colorer comme suit :

1° Vert acide de Poirier J. EEE.

Laver à l'alcool et traiter par :

2° Rouge neutre de Casella.

Monter les coupes dans l'acide borique à 3 p. 100 et luter.

Les composés pectiques et les mucilages apparaissent colorés en jaune orangé.

PROCÉDÉ DELAFIELD ET GUIRAUD [30]. — Les coupes fixées sont reçues dans un mélange à parties égales d'alcool à 60 degrés et de glycérine. Laisser en contact vingt minutes. Les porter dans un mélange à parties égales d'hématoxyline de Delafield, de glycérine et d'alcool à 60 degrés. Laisser en contact une minute. Laver rapidement dans un mélange d'alcool et de glycérine. Les mucilages se colorent en violet clair.

C. — Action de l'acétate double de benzidine sur les mucilages [31].

Nos premières séries d'expériences ont été faites sur la tige du *Tilia argentea*. Des coupes pratiquées dans ce végétal et immergées dans la solution d'acétate de benzidine montrent que les cellules mucilagineuses de la moelle et du parenchyme cortical prennent une coloration jaune clair. De plus, quoique traitées par un réactif aqueux, elles conservent leur forme originelle et montrent très nettement les stries concentriques résultant de la superposition des couches de mucilage. Nous avons poursuivi les mêmes recherches dans la graine de lin.

Nous avons immergé des graines de *Linum usitatissimum* dans le réactif. Au bout de vingt-quatre heures de contact, nous avons constaté que ces graines prennent une teinte noire due

probablement aux oxydases contenues dans les cellules mucilagineuses. Ces graines sont coriaces au toucher et non visqueuses comme les graines d'un même lot que nous avons immergées dans l'eau. Des coupes pratiquées dans ces graines et examinées dans une goutte du réactif montrent la couche mucilagineuse externe non gélifiée et colorée en brun. Nous avons répété ces expériences sur un grand nombre de végétaux, et nous avons pu constater que si toutes les cellules mucilagineuses ne se colorent pas comme celles du tilleul et de la graine de lin, toutes conservent leur forme originelle et montrent avec une remarquable netteté les stries caractéristiques. Nous avons cherché à augmenter encore la précision et la rapidité du réactif. De nouvelles recherches nous permirent de constater l'action toute spéciale de l'acétate de benzidine sur l'*acétate de cuivre*. Tandis que l'acétate de benzidine précipite avec beaucoup des métaux lourds, les résultats sont tout autres si on emploie l'acétate de cuivre. Il suffit d'ajouter à une solution d'acétate de benzidine une solution d'acétate de cuivre, pour voir apparaître une magnifique coloration *vert olive*. Cette solution, évaporée à une douce chaleur, laisse déposer de magnifiques cristaux noirs. D'autre part, l'acétate de cuivre est légèrement soluble dans la glycérine. Nous avons utilisé ces différentes propriétés pour fixer et colorer les mucilages.

Préparer les deux solutions suivantes :

B. — Benzidine.....	3 grammes.
Acide acétique cristallisable ...	40 grammes.
Alcool absolu q. s. p.	50. cc.

Faire dissoudre à chaud la benzidine dans l'acide acétique. Laisser refroidir et ajouter l'alcool.

B. — Glycérine.....	50 cc.
Alcool absolu.	50 cc.
Acétate de cuivre à saturation.	

Les coupes sont immergées vingt-quatre heures dans la solution A, puis montées dans la solution B.

Les mucilages se colorent rapidement en *jaune citron*.

D. — Applications à l'histo-chimie.

Althœa officinalis. — BOURGEON : COUPES TRANSVERSALES.

Axe. — Absence complète de cellules à mucilage au sommet. Elles se montrent à la partie moyenne.

Écailles. — Cellules à mucilage dans le mésophylle.

Les cellules à mucilage sont plus volumineuses que les autres. On y constate la présence de quatre régions épaissies. Chacune d'elles est formée par le boursoufflement de la paroi cellulaire. Ces épaississements mucilagineux se rejoignent presque à la partie centrale de la cellule et forment une étoile à quatre branches dans l'intervalle desquelles se trouve le protoplasma. Les stries mucilagineuses se montrent ici avec une remarquable netteté dans chaque épaississement.

COUPES LONGITUDINALES. — Apparition de cellules à mucilage à la partie moyenne de l'axe et dans le mésophylle des écailles. Ces cellules ont le même aspect que celui observé dans les coupes transversales.

RACINE : COUPES TRANSVERSALES. — Présence de cellules à mucilage dans toutes les régions de la coupe. L'épaississement des parois de la cellule se fait d'une façon uniforme. On constate à la périphérie, la présence de stries concentriques. Le protoplasma, refoulé au centre de la cellule, se présente sous la forme d'un petit cercle à contenu granuleux.

Malva sylvestris. — BOURGEON : COUPES TRANSVERSALES.

Axe. — Absence complète de cellules à mucilage au sommet. Elles se montrent à la partie moyenne.

Écailles. — Cellules mucilagineuses dans le mésophylle.

La cellule mucilagineuse est presque complètement envahie par le mucilage; on constate la présence de nombreux boursoufflements des parois cellulaires qui, faisant hernies à l'intérieur de la cellule, refoulent le protoplasma vers le centre.

COUPES LONGITUDINALES. — Apparition des cellules à mucilage à la partie moyenne de l'axe et dans le mésophylle des écailles.

Ces cellules ont le même aspect que celui observé dans les coupes transversales.

Lavatera. — BOURGEON : COUPES TRANSVERSALES.

Axe. — Absence complète de cellules à mucilage au sommet.

Elles se montrent à la partie moyenne. Les épaississements mucilagineux provenant toujours du boursoufflement des parois, sont beaucoup plus nombreux que dans les exemples précédents. On compte deux, trois épaississements pour chaque paroi. Le protoplasma cellulaire fortement refoulé vers le centre de la cellule sous l'influence de la pression exercée par le mucilage se présente sous la forme d'un hile de grain d'amidon de légumineuse. Chaque épaississement possède des stries concentriques.

Écailles. — Nombreuses cellules à mucilage dans le mésophylle.

COUPES LONGITUDINALES. — Permettent de mieux voir les épaississements propres des parois auxquels se surajoutent des boursoufflements multiples caractéristiques.

Hibiscus Syriacus. — BOURGEON : COUPES TRANSVERSALES.

Axe. — Absence complète de cellules à mucilage au sommet.

Elles se montrent à la base, au point d'insertion des premières écailles sur l'axe. Ces cellules présentent une forme ovale sans épaississement propre des parois. Toute la cavité cellulaire se montre remplie par un mucilage hyalin ne présentant pas de stries. Absence complète de protoplasma cellulaire.

Écailles. — Présentent dans leurs parenchymes de nombreuses cellules à mucilage construites sur le même type.

Brachychiton diversifolium. — BOURGEON : COUPES TRANSVERSALES.

Axe. — Absence complète de cellules à mucilage au sommet. Elles se montrent au point d'insertion des premières écailles sur l'axe, se fusionnent pour former de grosses poches. Toute la cavité est remplie par le mucilage. Présence de stries.

Écailles. — Renferment de nombreuses et grosses poches à mucilage.

COUPES LONGITUDINALES. — Montrent de volumineuses poches à mucilage, de forme cylindrique ; cellules hautes et présentant des stries. Ces cellules versent le contenu mucilagineux dans la

cavité centrale, qui présente également de nombreuses stries disposées sans ordre.

FEUILLE. — *Nervure médiane.* — Grosses poches à mucilage dans l'écorce externe et le cylindre central.

Parenchyme foliaire. — Présence de cellules à mucilage dans l'épiderme supérieur. Les parois internes de ces cellules se gélifient et présentent de nombreuses stries.

Rhanmus Frangula. — **BOURGEON : COUPES TRANSVERSALES.** — Présence de poches à mucilage remontant très haut dans l'axe. S'observent surtout dans l'écorce externe, puis apparaissent dans le cylindre central. Ces poches, de forme hexagonale, sont limitées par une rangée de petites cellules régulièrement disposées.

Tilla Argentea. — **BOURGEON : COUPES TRANSVERSALES.**

Axe. — Absence totale de cellules à mucilage au sommet. Apparition de poches à mucilage au niveau du point d'insertion des écailles sur l'axe. Elles sont volumineuses, parfois confluentes, et bordées par de petites cellules à parois très réfringentes et à contenu granuleux. Toute la cavité est remplie par du mucilage, lequel présente de nombreuses stries concentriques partant d'un même point, parfois de plusieurs.

Écailles. — Grande quantité de poches à mucilage dans le mésophylle ; quelques-unes refoulent les épidermes et forment des hernies au dehors.

COUPES LONGITUDINALES. — Poches à mucilage très nombreuses et disposées sur le même type.

Graine de lin. — **COUPES TRANSVERSALES.** — Assise épidermique de cellules à mucilage. Ces cellules sont hautes, à parois latérales minces, à parois externes fortement épaissies et se présentant sous la forme d'une croûte. Le contenu cellulaire présente nettement la striation caractéristique.

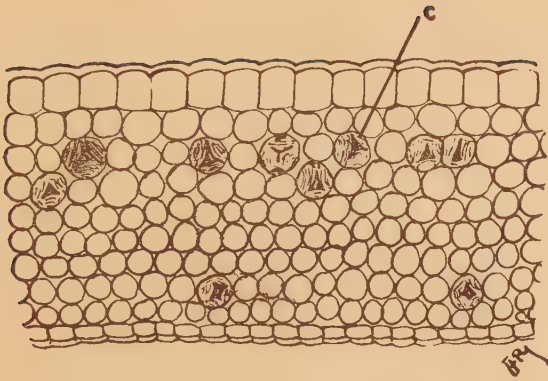


FIG. 3. — Écaille d'un bourgeon de Guimauve après traitement par l'acétate de benzidine et l'acétate de cuivre : C, cellule à mucilage.

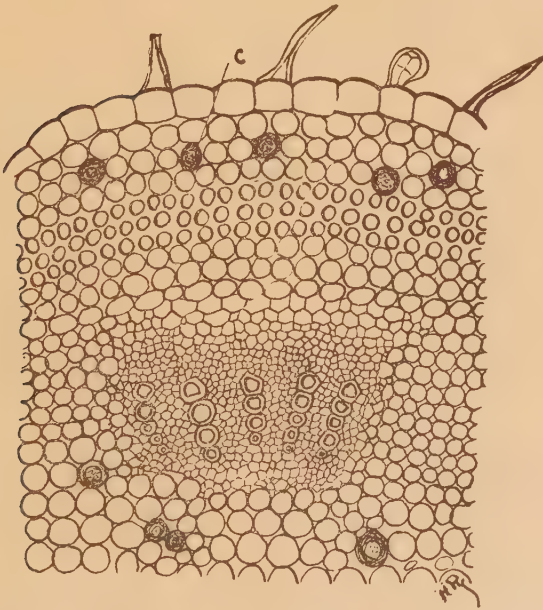


FIG. 4. — Tige de Mauve après traitement par l'acétate de benzidine et l'acétate de cuivre : C, cellule à mucilage.

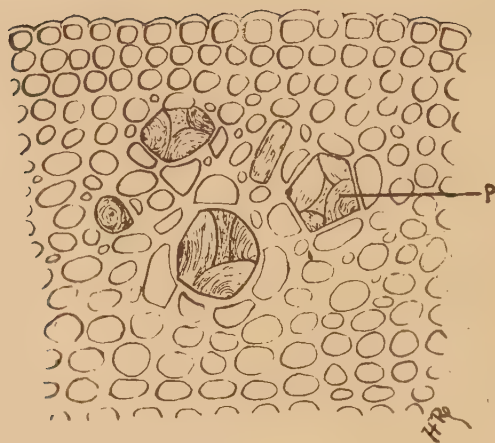


FIG. 5. — Parenchyme cortical d'une tige primaire de Tilleul après traitement par l'acétate de benzidine et l'acétate de cuivre : P, poche à mucilage.

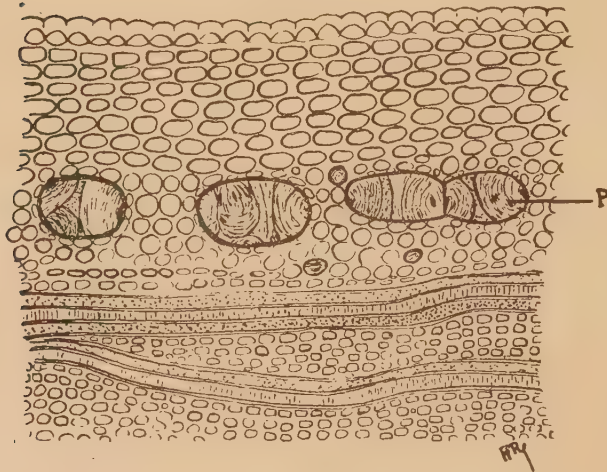


FIG. 6. — Coupe longitudinale d'une jeune tige de Tilleul après traitement par l'acétate de benzidine et l'acétate de cuivre : P, poche à mucilage.

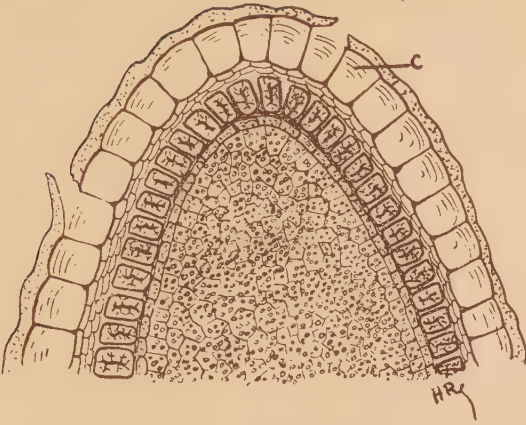


FIG. 7. — Coupe transversale d'une graine de Lin
après traitement par l'acétate de benzidine et l'acétate de cuivre :
C, cellule à mucilage.

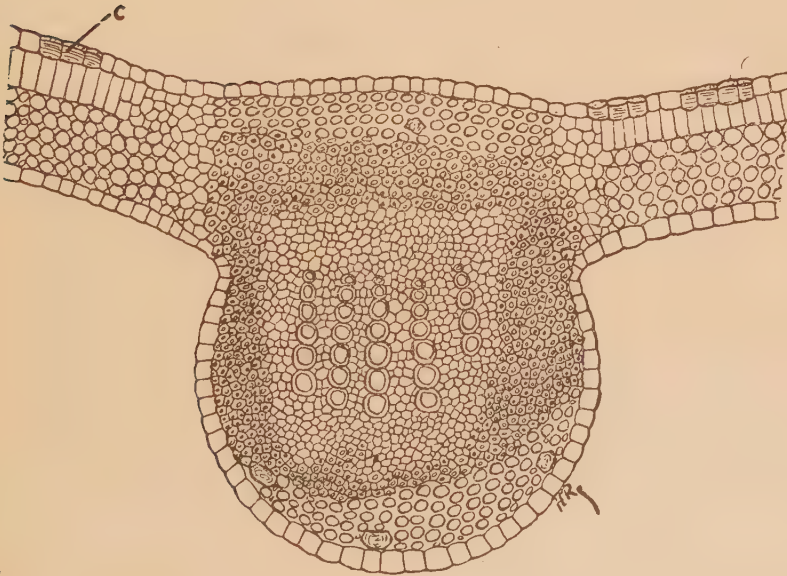


FIG. 8. — Feuille de *Brachychiton diversifolium*
après traitement par l'acétate de benzidine et l'acétate de cuivre :
C, cellule à mucilage.

CONCLUSIONS

Le travail que nous venons d'exposer et qui résume les résultats de nos recherches sur l'emploi de l'acétate de benzidine comme réactif histo-chimique a été divisé en trois chapitres :

CHAPITRE I. — Nous avons étudié l'action de ce réactif sur les *pentosanes*. Il produit presque instantanément une coloration jaune orangé plus ou moins intense. Il permet, par suite, de mettre en relief les tissus sclérifiés, lignifiés et subérifiés. Nous en avons déduit une technique simple et rapide de coloration des coupes ;

CHAPITRE II. — Nous avons étudié l'action de ce réactif sur les *lévulosanes*. Il produit presque instantanément avec ces glucides des combinaisons cristallisées. La réaction est extrêmement sensible. Nous avons pu localiser ces glucides dans tous les organes de plantes à lévulosanes, et, en particulier, dans les feuilles où ils n'avaient pas encore, à notre connaissance, été signalés. Nous en avons conclu qu'ils sont, comme l'amidon et les composés en C⁶, des produits de l'action chlorophyllienne ;

CHAPITRE III. — Nous avons étudié l'action de ce réactif sur les *mucilages*. Il fixe et colore les mucilages en jaune. Pour rendre la réaction plus sensible, nous avons utilisé la propriété qu'a l'acétate de benzidine de se combiner à l'acétate de cuivre pour donner une réaction de coloration soluble dans l'alcool et la glycérine. Ce réactif fixe et colore les mucilages en jaune

citron. Il nous a permis de localiser les mucilages dans les tissus végétaux et nous avons pu préciser, dans un grand nombre de cas, à quel niveau dans le bourgeon apparaissaient ces productions. Nous avons enfin pu mettre en évidence le rôle joué par la paroi cellulaire dans la formation du mucilage et montrer que la production du mucilage ne provenait pas dans tous les cas de la paroi tout entière, mais de certaines portions de la paroi, cette particularité étant assez constante pour un même genre.

Vu :

Le Doyen,

C. SIGALAS.

VU, BON A IMPRIMER :

Le Président,

L. BEILLE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 18 mai 1928.

Le Recteur de l'Académie,

F. DUMAS.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. MANGIN. — Sur la constitution de la membrane des végétaux. *C. R. Ac. Sc.*, Paris, 1888.
2. — Sur les réactifs iodés de la cellulose. *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1880.
3. BEILLE. — *Précis de botanique pharmaceutique*, p. 163, 1925.
4. FOURMENT et ROQUES (Henry). — L'acétate de diphénylène diamine, fixateur et colorant microchimique des tissus végétaux renfermant le groupement moléculaire des pentosanes. *Bull. des travaux de la Soc. de pharmacie de Bordeaux*, t. I, 1926.
5. ROSE. — *Journ. der Chemie*, t. III, p. 217.
6. VILLE et JOULIE. — *Mon. Soc.*, 1866, p. 836.
7. MÜLLER. — *Arch. de pharmacie*, 3^e série, t. II, 1873.
8. EKSTRAND et JOHANSON. — *Ber. d. d. chem. Ges.*, t. XXI, 1888.
9. TANRET. — *Bull. Soc. chim.*, t. IX, 1893.
10. ROQUES (Henry). — Sur un nouveau procédé de localisation des lévulosanes dans les végétaux. *Bull. des travaux de la Soc. de pharmacie de Bordeaux*, t. III, 1926.
11. POLACCI et KIMPELIN. — Essai sur l'assimilation chlorophyllienne du carbone. Thèse Lyon, 1908.
12. ROUGE. — Premiers produits de l'assimilation chlorophyllienne. *J. suisse de pharm.*, t. LIX, nos 11 et 12.
13. STOLL-WILLSTATTER. — Untersuchungen ueber die assimilation der Kohlensäure. Berlin, 1918.
14. GRAFE et VOUK. — *Biochimie Zeitschr.*, t. XLIII, p. 127, et t. XLVII, p. 320.
15. COLIN. — La genèse des lévulosanes chez les végétaux. *Bull. de la Soc. de chimie biologique*, février 1925, t. VII, n° 2.

16. BRANDZA. — Sur l'anatomie et le développement des téguments de la graine de lin. *Bull. Société biologie*, 9^e série, t. I, 1889.
17. KÜTZING. — Grundzüge der philorôphischen Botanik.
18. CRAMER. — Ueber das Vorkommen und die Entstehung einiger Pflanzenscheime, 3 Heft, 1855.
19. HOFMEISTER. — Ueber die zu gallerte auf quellenden zellen der Hussenfläche von samen und Perikarprien. Bericht der Kön sächs Gesellschaft der Wissenschaften math physich classe, 1858.
20. FRANK. — Ueber die anatomische. Bedentung und die Entstehung der vegetabilischer schleime. *Pringsh. Jahrb.*, t. V, 1866, 1867.
21. MANGIN. — *Bull. Soc. bot. de France*, XL, 1893.
22. TSCHIRCH. — Augewandte anatomie.
23. MANGIN. — Sur un essai de classification des mucilages. *Bull. Soc. bot. de Fr.*, t. XLI, août 1894.
24. LUTZ. — Contribution à l'étude chimique et botanique des gommès. Thèse pharm., 1895.
25. MANGIN. — *Bull. Soc. bot. de France*, t. XL, 1893, p. 119.
26. KRUCH. — Lepidermide mucilagginosa nelle flogie delle dicotiledoni. Recherche anatomiche e biologiche. *Annuario del R. Istituto botanico di Roma*, 1896, VI, fasc. 3.
27. VALLICZEK. — *Pringsh. Jahrb.*, 1893, XXV, p. 225.
28. ROUSSEAU. — Thèse de doctorat. Étude de quelques espèces du genre Malva et Lavatera. Paris, 1925.
29. LUTZ. — Contribution à l'étude chimique et botanique des gommès. Thèse pharm., 1895.
30. GUIRAUD. — Développement et localisation des mucilages chez les malvacées officinales. Thèse diplôme pharmacien, supérieur, Montpellier, 1894.
31. ROQUES (Henry). — Sur un nouveau procédé de fixation et de coloration des mucilages chez les végétaux. Extrait des *Comptes rendus des séances de la Société de biologie de Bordeaux*, t. XCVII, p. 85.

